

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Juli 2001 (12.07.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/49880 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (74) Anwalt: GINZEL, Christian; Zimmermann & Partner,
Postfach 330 920, 80069 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/13288 (81) Bestimmungsstaat (national): US.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
27. Dezember 2000 (27.12.2000) (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- (30) Angaben zur Priorität:
199 63 857.8 30. Dezember 1999 (30.12.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4,
40724 Hilden (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KORFHAGE, Chris-
tian [DE/DE]; Sepp-Herberger-Strasse 6c, 40674 Langen-
feld (DE). OELMÜLLER, Uwe [DE/DE]; Millrather Weg
46, 40699 Erkrath (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PRIMERS, IN PARTICULAR, FOR PRIMER-DEPENDENT NUCLEIC ACID SYNTHESIS PROCESSES AND NU-
CLEIC ACID AMPLIFICATION METHODS

(54) Bezeichnung: PRIMER, INSBESONDERE FÜR PRIMER-ABHÄNGIGE NUKLEINSÄURE-SYNTHESEPROZESSE
UND NUKLEINSÄURE-AMPLIFIKATIONSVERFAHREN

(57) Abstract: The invention relates to primers which exhibit a high specificity and efficiency during hybridization with a target nucleic acid. To this end, the invention provides that a high proportion of bases, which can form two hydrogen bridge-type bonds with the corresponding bases in a target molecule, are predominant on the 3'-end of the hybridizing part of the primer. The 5'-end of the hybridizing part advantageously comprises a high proportion of bases which can form three hydrogen bridge-type bonds with the corresponding bases in the target molecule. The inventive primers are suited for use in primer-dependent nucleic acid synthesis processes, such as DNA syntheses and nucleic acid amplification methods, in particular, isothermal amplification methods. The inventive primers make it possible to significantly increase the yield of a specific amplification product and to reduce the production of undesired byproducts.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung gibt Primer an, welche eine hohe Spezifität und Effizienz bei der Hybridisierung mit einer Zielnukleinsäure zeigen. Erreicht wird dies im Wesentlichen dadurch, daß am 3'-Ende des Hybridisierenden Teils des Primers ein hoher Anteil an Basen vorherrscht, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können. Das 5'-Ende des hybridisierenden Teils weist vorteilhafterweise einen hohen Anteil an Basen auf, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können. Die erfindungsgemäßen Primer sind geeignet für die Verwendung bei Primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen, wie DNA-Synthesen, und Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, insbesondere isothermale Amplifikationsverfahren. Mit den erfindungsgemäßen Primern kann die Ausbeute an spezifischen Amplifikationsprodukt signifikant erhöht und die Produktion unerwünschter Nebenprodukte signifikant unterdrückt werden.

WO 01/49880 A2

Primer, insbesondere für Primer-abhängige Nukleinsäure-Syntheseprozesse und Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Primer, insbesondere für Primer-abhängige Nukleinsäure-Syntheseprozesse und Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, Primergemische, ein Verfahren zur Herstellung von Primern, die Verwendung der Primer in Nukleinsäure-Syntheseprozessen und Nukleinsäure-

10 Amplifikationsverfahren sowie Kits enthaltend entsprechende Primer.

Zunächst werden nachfolgend einige Begriffsdefinitionen angegeben.

15

Unter einem Enzym für die Nukleinsäure-Polymerisation ist eine Klasse von Enzymen zu verstehen, welche Phosphodiester-Bindungen zwischen einzelnen Nukleotiden innerhalb eines Nukleinsäure-Stranges katalysieren (Nukleinsäure-Polymerasen). Unter einem Enzym für die Nukleinsäure-Ligation ist eine Klasse von Enzymen zu verstehen, die Phosphodiester-Bindungen zwischen den endständigen Nukleotiden zweier Nukleinsäure-Stränge katalysieren (z.B. Nukleinsäure-Ligasen).

20

25

Häufig verwendete Enzyme zum Zwecke der Nukleinsäure-Polymerisation sind DNA- oder RNA-Polymerasen. Darunter sind unabhängig von ihrer stofflichen Natur Enzyme zu verstehen, welche eine Kondensationsreaktion zwischen dem 3'-Ende (OH-Ende) der Desoxyribose oder Ribose einer Nukleinsäure und einem Säurerest, der mit der Desoxyribose oder Ribose des eintretenden Nukleotids verknüpft ist, katalysieren. Als Matrize dient dabei eine Nukleinsäure, und zwar beispielsweise eine RNA (Ribonukleinsäure) bei RNA-abhängigen Polymerasen und eine DNA (Desoxyribonukleinsäure) bei DNA-abhängigen

30 Polymerasen.

Nukleinsäure-Synthesen sind beispielsweise Schlüsselreaktionen bei der Amplifikation und Klonierung von Nukleinsäuren. Des weiteren werden sie beispielsweise bei diagnostischen Verfahren eingesetzt.

- 5 Unter den Begriff Nukleinsäure fallen insbesondere RNA und DNA in allen Längen und Konfigurationen, wie Doppelstrang, Einzelstrang, zirkulär, linear, verzweigt etc. Des weiteren fallen darunter Oligomere, Plasmide, Viroide, virale, bakterielle und archaebakterielle DNA und RNA, genomische und nicht-genomische DNA und RNA aus Tier-, Pilz- und Pflanzenzellen oder anderen
- 10 Eukaryonten, tRNA, mRNA in prozessierter und unprozessierter Form, hnRNA, rRNA, cDNA und alle anderen denkbaren Nukleinsäuren.

Der Nukleinsäure-Erststrang ist der Nukleinsäurestrang, welcher während der Primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthese durch ein Enzym, wie z.B. DNA- oder RNA-Polymerase, Ligase etc.; gebildet wird und komplementär zur Sequenz einer Zielnukleinsäure ist.

15

Der Nukleinsäure-Zweitstrang ist der Nukleinsäurestrang, welcher während der Primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthese durch ein Enzym gebildet wird und komplementär zur Sequenz des Erststrangs ist.

20

Als eine Zielnukleinsäure wird eine Nukleinsäure definiert, die spezifisch einen definierten Primer binden, d.h. mit diesem hybridisieren, kann. Die Zielnukleinsäure dient nach der Primer-Bindung bei der primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthese durch ein Enzym, z.B. DNA- oder RNA-abhängige Polymerasen, als Matrize des zu synthetisierenden Nukleinsäure-Stranges, wobei die Sequenz des zu synthetisierenden Nukleinsäure-Stranges komplementär zur Sequenz der Zielnukleinsäure ist. Spezifische Bindung bedeutet dabei nicht, daß 100% Komplementarität zwischen Zielnukleinsäure und hybridisierendem Teil des

25

30 Primers vorliegen muß. Bis zu maximal 50% der Basen im hybridisierenden Bereich zwischen Primer und Zielnukleinsäure dürfen nicht-komplementär sein, um noch brauchbare Ergebnisse zu erzielen. Gute bis sehr gute Ergebnisse können erreicht werden, wenn nicht mehr als 30% der Basen des hybridisieren-

den Teils des Primers und der Zielnukleinsäure nicht-komplementär sind. Je höher der Grad an Komplementarität zwischen dem hybridisierenden Teil des Primers und der Zielnukleinsäure ist, desto spezifischer und effektiver ist der Primer.

5

Die Zielsequenz ist zum einen die Sequenz, welche die Primer-Bindestelle enthält, und zum anderen die Sequenz, die in 3'-Richtung (stromabwärts) von der Primer-Bindestelle liegt. Bei der Primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthese wird eine Nukleinsäuresequenz gebildet, die komplementär zur Zielsequenz ist.

10

Primer sind Starter für die Nukleinsäure-Synthese. Es handelt sich meist um kurzkettige, einzelsträngige Oligoribo- oder Desoxyribonukleotide, die zu einem Bereich auf einem einzelsträngigen Nukleinsäuremolekül zu mindestens 50% komplementär sind (siehe oben) und mit diesem zu einem Doppelstrang reagieren können. Das freie 3'-Hydroxy-Ende in diesem Doppelstrang dient als Substrat für Nukleinsäure-Polymerasen, wie beispielsweise RNA- und DNA-Polymerasen, und als Startstelle für die Aufpolymerisierung des gesamten Einzelstrangs zum Doppelstrang. Primer sind allgemein definiert als ein oligomeres Startermolekül, das sequenzspezifisch an die Zielnukleinsäure binden kann. Die Sequenz der Zielnukleinsäure, die den Primer bindet, wird als Primer-Bindestelle bezeichnet. Dabei kann ein Primer durchaus auch verschiedene Zielnukleinsäuren binden, wenn diese alle die gleiche oder eine ähnliche Sequenz als Primer-Bindestelle enthalten. Ein erster oder primärer Primer P1 wird als „anti-sense Primer“ und ein zweiter oder sekundärer Primer P2 wird als „sense Primer“ definiert.

15

20

25

Als Zweitstrangsynthese-Primer wird ein „sense Primer“ definiert, der entweder ein sekundärer, der Reaktion von außen zugeführter Primer P2 oder ein durch die Rückfaltung des Nukleinsäure-Erststrangs gebildeter Primer (sog. „Hairpin Loop“) ist.

30

Eine Primer-Bindestelle ist die Sequenz der Zielnukleinsäure, die den Primer durch Hybridisierung binden kann. Die Sequenz der Primer-Bindestelle ist zu

mindestens 30%, bevorzugt mindestens 50%, besonders bevorzugt 100%, komplementär zur Sequenz des Primers.

Der hybridisierende Anteil des Primers ist der Sequenzteil des Primers, der an
5 das primäre Zielmolekül hybridisiert und zu der Sequenz der Primer-Bindestelle des primären Zielmoleküls in mindestens 50% der Basen komplementär ist. Das primäre Zielmolekül ist das Nukleinsäuremolekül, das in die enzymatische Reaktion eingesetzt wird. Es ist nicht Produkt dieser Reaktion.

10 Die durch Enzyme, wie insbesondere DNA- und RNA-abhängige Polymerasen oder Ligasen katalysierte, Primer-abhängige Nukleinsäure-Synthese ist eine Schlüsselreaktion bei der cDNA-Synthese, DNA-Sequenzierung und bei Amplifikationsverfahren wie z.B. der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)/RT-PCR oder
15 den isothermalen Amplifikationsverfahren NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), 3SR (Self-Sustained Sequence Replication; beinhaltet die Verwendung von RNase H), 2SR (Self-Sustained Sequence Replication; ähnlich wie 3SR, aber ohne Verwendung von RNase H), TMA (Transcription Mediated Amplification), SDA (Strand Displacement Amplification), LCR (Ligase Chain Reaction) OLA (Oligo Ligation Assay) und verwandte Methoden. Die Effizienz der Primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthese wird beeinflusst durch die
20 Aktivität des Enzyms für die Nukleinsäure-Polymerisation (z.B. einer DNA-Polymerase), durch die Zielnukleinsäure und durch Effizienz und Spezifität der Primer-Hybridisierung. Die Effizienz und Spezifität der Primer-Hybridisierung hängt wiederum entscheidend von den verwendeten Salzen und Salzkonzentrationen in der Syntheselösung, von der Sequenz der Zielnukleinsäure und von
25 der Sequenz der Primer ab. Nachfolgend werden einige Anwendungsbeispiele für Primer-abhängige Nukleinsäure-Syntheseprozesse näher beschrieben.

30 Primer-abhängige Nukleinsäure-Synthese-Reaktionen findet man z.B. bei Erst- und Zweitstrang-cDNA-Synthesen, bei der DNA-Sequenzierung, bei auf Primer-Bindung basierenden Mutageneseprozessen und anderen Verfahren. Dabei werden sequenzspezifisch gestartete Nukleinsäure-Synthesereaktionen durchgeführt unter Einsatz von Enzymen, wie z.B. RNA- oder DNA-abhängigen DNA-

Polymerasen, wobei die sequenzspezifisch gestarteten DNA-Synthesereaktionen folgende Schritte enthalten:

- (1) Sequenzspezifische Hybridisierung eines ersten Primers P1 an eine zu diesem komplementäre Sequenz der Zielnukleinsäure (RNA oder DNA); und
- (2) Verlängerung des Primers P1 durch den katalysierten Einbau von Desoxyribonukleotiden an das freie 3'-OH Ende des zu verlängernden Primers P1 mittels eines Enzyms, wie z.B. einer RNA-abhängigen oder DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei die Zielnukleinsäure als Matrize dient, und der Primer P1 insgesamt oder zumindest im 3'-Bereich eine Sequenz enthält, die komplementär zur einer bestimmten Sequenz der Zielnukleinsäure ist und sequenzspezifisch an diese Zielsequenz hybridisieren kann und wobei der Primer P1 im 5'-Bereich eine Sequenz enthalten kann, die nicht komplementär zur Zielnukleinsäure ist und nicht an der Zielnukleinsäure hybridisieren kann und zusätzliche Funktionen enthalten kann. Die Synthese läuft bis zum Ende der Zielnukleinsäure (Matrize) oder kann vor dem Ende unterbrochen werden, womit die Erststrang-Nukleinsäure-Synthese beendet ist.
- (3) Die Nukleinsäure-Zweitstrangsynthese beginnt durch die sequenzspezifische Hybridisierung eines Zweitstrangsynthese-Primers (ZP). Der Zweitstrangsynthese-Primer kann sein ein separater, der Reaktion zugeführter Primer P2, ein Degradierungsprodukt der Zielnukleinsäure oder ein durch die Rückfaltung des Nukleinsäure-Erststrangs gebildeter Primer (Hairpin Loop).
- (4) Verlängerung des ZP durch den katalysierten Einbau von Nukleotiden an das freie 3'-OH Ende des zu verlängernden ZP mittels eines Enzyms, wobei der Nukleinsäure-Erststrang der Zielnukleinsäure als Matrize dient; der ZP enthält insgesamt oder zumindest im 3'-Bereich eine Sequenz, die komplementär zu einer bestimmten Sequenz der Zielnukleinsäure ist und sequenzspezifisch an diese Zielsequenz hybridisieren kann und der ZP kann im 5'-Bereich eine Sequenz enthalten, die nicht komplementär zur Zielnukleinsäure ist, als Folge davon nicht an der Zielnukleinsäure hybridisieren kann, zusätzliche Funktionen enthalten kann und wobei der ZP die gleiche oder eine zu dem Primer P1 unterschiedliche Sequenz aufweisen kann.

Die Primer-abhängige Synthese Reaktion ist auch bei der Sequenzierung eine Schlüsselreaktion. Das Verfahren der Nukleinsäure-Sequenzierung folgt im wesentlichen dem schon vorstehend unter Primer-abhängige Nukleinsäure-

5 Synthese Reaktion beschriebenen Verfahren und beschränkt sich auf die Schritte (1) und (2), wobei im Falle einer DNA-Synthese anstelle der Desoxyribonukleotide eine Mischung aus Desoxyribonukleotiden und Didesoxyribonukleotiden zum katalysierten Einbau durch Enzyme, wie z.B. RNA- oder DNA-abhängige DNA-Polymerasen, verwendet wird.

10 Dabei werden die sequenzspezifisch gestarteten Nukleinsäure-Synthesereaktionen zur Sequenzierung durchgeführt durch Enzyme, wie beispielsweise RNA- oder DNA-abhängige DNA-Polymerasen, wobei die sequenzspezifisch gestarteten DNA-Sequenzreaktionen folgende Schritte enthalten:

- 15
- (1) Sequenzspezifische Hybridisierung eines Primers P1 an eine zu diesem komplementäre Sequenz der Ziel-Nukleinsäure (RNA oder DNA).
 - (2) Verlängerung des Primers P1 durch den katalysierten Einbau von Desoxyribonukleotiden und Didesoxyribonucleotiden an das freie 3'-OH Ende des zu
20 verlängernden Primers P1 durch Ein Enzym, z.B. eine RNA-abhängige oder DNA-abhängige DNA-Polymerase, wobei die Zielnukleinsäure als Matrize dient, der Primer P1 insgesamt oder zumindest im 3'-Bereich eine Sequenz enthält, die komplementär zur einer bestimmten Sequenz der Zielnukleinsäure ist und sequenzspezifisch an diese Zielsequenz hybridisieren kann und
25 der Primer P1 im 5'-Bereich eine Sequenz enthalten kann, die nicht komplementär zur Zielnukleinsäure ist, nicht an der Zielnukleinsäure hybridisieren kann und zusätzliche Funktionen enthalten kann.

30 Primer-abhängige Nukleinsäure-Synthese-Reaktionen findet man auch bei auf Primer-Bindung basierenden Mutageneseprozessen. Dabei beruhen diese Mutagenesemethoden auf der sequenzspezifischen Bindung eines Primers oder mehrerer Primer, der/die mindestens eine Mutation aufweist/aufweisen. Im

einzelnen umfassen die auf Primer-Bindung basierenden Mutageneseprozesse folgende Schritte:

(1) Sequenzspezifische Hybridisierung eines (oder mehrerer) Primer(s) P1 (P1_n) an eine zu diesem/diesen komplementäre Sequenz der Zielnukleinsäure (RNA oder DNA).

(2) Verlängerung des (oder der) Primer(s) P1(P1_n) durch den katalysierten Einbau von Nukleotiden an das freie 3'-OH Ende des (oder der) zu verlängern- den Primer(s) durch ein Enzym, z.B. eine RNA-abhängige oder DNA-abhängige DNA-Polymerase, wobei die Zielnukleinsäure als Matrize dient, wobei der oder die Primer P1 (P1_n) insgesamt oder zumindest im 3'-Bereich eine Sequenz enthält/enthalten, die komplementär zur einer bestimmten Sequenz der Zielnukleinsäure ist und sequenzspezifisch an diese Zielsequenz hybridisieren kann, der oder die Primer P1 (P1_n) innerhalb der zur Zielsequenz komplementären Sequenz mindestens eine Mutation aufweist/aufweisen, d.h. eine im Vergleich zur Nukleotidabfolge der Zielsequenz nicht komplementäre Base und der/die Primer P1(P1_n) im 5'-Bereich eine Sequenz enthalten kann/können, die nicht komplementär zur Zielnukleinsäure ist, nicht an der Zielnukleinsäure hybridisieren kann und zusätzliche Funktionen enthalten kann.

(3) Die Nukleinsäure-Zweitstrangsynthese wird dann begonnen durch eine sequenzspezifische Hybridisierung eines P2, eines Degradationsprodukts der Zielnukleinsäure oder durch die Rückfaltung des Nukleinsäure-Erststrangs an die zu diesem komplementäre Sequenz des DNA-Erststranges der Zielnukleinsäure.

(4) Verlängerung des P2 durch den katalysierten Einbau von Desoxyribonukleotiden an das freie 3'-OH Ende des zu verlängern- den P2 mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei der DNA-Erststrang der Zielnukleinsäure als Matrize dient, und der P2 insgesamt oder zumindest im 3'-Bereich eine Sequenz enthält, die komplementär zur einer bestimmten Sequenz der Zielnukleinsäure ist und sequenzspezifisch an diese Zielsequenz hybridisieren kann, und wobei der P2 im 5'-Bereich eine Sequenz enthalten kann, die nicht komplementär zur Zielnukleinsäure ist, als Folge davon nicht

an der Zielnukleinsäure hybridisieren kann und zusätzliche Funktionen enthalten kann und wobei der P2 die gleiche oder eine zu Primer P1 unterschiedliche Sequenz aufweisen kann.

- 5 Primer-abhängige Nukleinsäure-Synthese-Reaktionen findet man ebenfalls bei Erst- und Zweitstrang-DNA-Synthesen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei werden die sequenzspezifisch gestarteten DNA-Synthesereaktionen durchgeführt durch hitzestabile RNA- und/oder DNA-abhängige DNA-Polymerasen, wobei die sequenzspezifisch gestarteten DNA-
- 10 Synthesereaktionen folgende Schritte enthalten:
- (1) Initiale thermische Denaturierung der Zielnukleinsäure;
 - (2) Sequenzspezifische Hybridisierung zweier Primer P1 und P2 an eine zu diesen komplementäre Sequenz der Zielnukleinsäure;
 - 15 (3) Verlängerung der Primer P1 und P2 durch den katalysierten Einbau von Desoxyribonukleotiden an das freie 3'-OH Ende der zu verlängernden Primer P1 und P2 durch eine hitzestabile RNA-abhängige oder DNA-abhängige DNA-Polymerase, wobei die Zielnukleinsäure als Matrize dient;
 - (4) die Primer-Verlängerungsprodukte ihrerseits nach Eingang in Schritt (1)
 - 20 wieder als Matrize zur Primer-Hybridisierung der Primer P1 und P2 dienen; und
 - (5) die Schritte (1) bis (4) beliebig häufig wiederholt werden können und so die Nukleinsäure mit den gewünschten Eigenschaften synthetisiert werden kann, wobei die Primer P1 und P2 insgesamt oder zumindest im 3'-Bereich eine
 - 25 Sequenz enthalten, die komplementär zu einer bestimmten Sequenz der Zielnukleinsäure ist und sequenzspezifisch an diese Zielsequenz hybridisieren kann und wobei die Primer P1 und P2 im 5'-Bereich eine Sequenz enthalten können, die nicht komplementär zur Zielnukleinsäure ist und nicht an der Zielnukleinsäure hybridisieren kann und zusätzliche Funktionen enthalten
 - 30 kann.

Sequenzspezifisch gestartete Nukleinsäure-Synthesereaktionen sind des weiteren Bestandteil von auf *in-vitro* Transkription basierenden, isothermalen, exponentiellen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren wie z.B. NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), 2SR (Self-Sustained Sequence Replication ähnlich 3SR, jedoch ohne Verwendung von RNase H), TMA (Transcription-Mediated Amplification), und ähnlichen Verfahren. Bei diesen Methoden verwendet man sequenzspezifisch bindende Primer, RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerasen, RNA-Polymerasen und geeignete Reaktionsbedingungen, wobei die exponentiellen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren folgende Schritte umfassen:

- (1) Herstellung eines einzigen Reaktionsmediums, welches eine Zielnukleinsäure, einen ersten Primer P1, einen zweiten P2, eine RNA-abhängige DNA Polymerase, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, Ribonukleotide und Desoxyribonukleotide enthält;
- (2) Einstellung von Reaktionsbedingungen, so daß Amplifikationszyklen aufrecht erhalten werden können, wobei
- (3) die Erststrang-DNA-Synthese komplementär zur Zielnukleinsäure durchgeführt wird durch die Hybridisierung eines Primers P1 an eine komplementäre Zielsequenz, gefolgt von einer Verlängerung des Primers P1 durch Desoxyribonukleotide unter Verwendung einer RNA- oder DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei die Zielnukleinsäure entweder eine DNA oder eine RNA sein kann, und
- (4) die Synthese der Zweitstrang-DNA komplementär zur Erststrang-DNA durchgeführt wird durch die enzymatische, thermische oder chemische Denaturierung oder Degradation der Zielnukleinsäure von der Erststrang-DNA und die Hybridisierung eines P2 an die komplementäre Erststrang-DNA gefolgt von einer Verlängerung des P2 durch Desoxyribonukleotide unter Verwendung einer RNA- oder DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei die Primer P1 und P2 im 3'-Bereich eine Sequenz enthalten, die komplementär zur einer bestimmten Sequenz der Zielnukleinsäure ist und sequenzspezifisch an diese Zielsequenz hybridisieren kann und wobei mindestens einer der Primer P1 oder P2 oder beide Primer im 5'-Bereich eine Sequenz ent-

halten, die nicht komplementär zur Zielnukleinsäure ist und nicht an der Zielnukleinsäure hybridisieren kann und eine DNA-abhängige RNA-Polymerase Promotorsequenz enthält,

- (5) von dem aus eine *in-vitro* Transkription des in den Schritten (1) bis (4) synthetisierten DNA-Moleküls durch die Verwendung von DNA-abhängiger RNA-Polymerase und Ribonukleotiden durchgeführt werden kann, wobei die entstehenden *in-vitro* Transkripte wiederum als Matrize dienen und unter sequenzspezifischer Hybridisierung von Primer P1 und P2 erneut Eingang in DNA-Erst- und Zweitstrang-Synthese finden, gefolgt von *in-vitro* Transkription. Auf diese Weise wird eine exponentielle Amplifikation der Nukleinsäure erreicht.

Sequenzspezifisch gestartete Nukleinsäure-Synthesereaktionen sind außerdem Bestandteil von auf *in-vitro* Transkription basierenden, linearen, isothermalen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren. Diese Methoden werden unter Verwendung sequenzspezifisch bindender Primer, von RNA- und DNA-abhängigen DNA-Polymerasen, und RNA-Polymerasen bei geeigneten Reaktionsbedingungen durchgeführt, wobei isothermale, lineare Nukleinsäure-Amplifikationen folgende Schritte umfassen:

- (1) Herstellung eines einzigen Reaktionsmediums, welches eine Zielnukleinsäure, einen ersten Primer P1, einen zweiten P2, eine RNA-abhängige DNA Polymerase, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, Ribonukleotide und Desoxyribonukleotide enthält,
- (2) Durchführung der Erststrang-DNA-Synthese komplementär zur Zielnukleinsäure durch die Hybridisierung eines Primers P1 an eine komplementäre Zielsequenz gefolgt von einer Verlängerung des Primers P1 durch Desoxyribonukleotide unter Verwendung einer RNA- oder DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei die Zielnukleinsäure entweder eine DNA oder eine RNA sein kann;
- (3) die Synthese der Zweitstrang-DNA wird komplementär zur Erststrang-DNA durchgeführt durch die enzymatische, thermische oder chemische Wegnahme der Zielnukleinsäure von der Erststrang-DNA und die Hybridisierung ei-

nes P2 an die komplementäre DNA des Erststrangs. Die Nukleinsäure-Zweitstrang-Synthese beginnt durch die sequenzspezifische Hybridisierung eines zweiten P2, eines Degradierungsprodukts der Ziehnukleinsäure oder durch die Rückfaltung des Nukleinsäure-Erststrangs an die zu diesem komplementäre Sequenz des Nukleinsäure-Erststrangs der Ziehnukleinsäure. Darauf folgt eine Verlängerung des P2 durch Desoxyribonukleotide unter Verwendung einer RNA- oder DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei die Primer P1 und P2 im 3'-Bereich eine Sequenz enthalten, die komplementär zu einer bestimmten Sequenz der Ziehnukleinsäure ist und sequenzspezifisch an diese Zielsequenz hybridisieren kann und wobei mindestens einer der Primer P1 oder P2 oder die Primer P1 und P2 im 5'-Bereich eine Sequenz enthalten, die nicht komplementär zur Ziehnukleinsäure ist und nicht an der Ziehnukleinsäure hybridisieren kann, und eine DNA-abhängige RNA-Polymerase eine Promotorsequenz enthält, von der aus eine *in-vitro* Transkription des in den Schritten (1) bis (3) synthetisierten DNA-Moleküls durch die Verwendung von DNA-abhängiger RNA-Polymerase und Ribonukleotiden durchgeführt werden kann. Auf diese Weise wird eine lineare Amplifikation der Nukleinsäure erreicht.

Bisher sind nur wenige Regeln zum Aufbau des hybridisierenden Anteils von Primern bekannt, die für sequenzspezifisch gestartete Nukleinsäure-Synthesereaktion unter Verwendung von Enzymen, z.B. Polymerasen oder Ligasen, oder zum Zwecke von enzymatischen Reaktionen, die sequenzspezifisch gestartete Nukleinsäure-Synthesereaktionen unter Verwendung von Enzymen, z.B. DNA-Polymerasen, als Schlüsselreaktion enthalten, eingesetzt werden (Dieffenbach et Dveksler, PCR Primer – a Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1995; ISBN: 0879694483, bes. S. 131-155; Sooknanan et al., Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, in: Wiedbrauk et Farkas (Hrsg.), Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press 1995, S. 261-285; ISBN: 0127489207). Bisher aufgestellte Primerregeln besagen, daß

(1) der hybridisierende Sequenzanteil der Primer einen GC-Gehalt von 40-60 % aufweisen sollte;

(2) der hybridisierende Sequenzanteil der Primer eine Länge von 20-25 Nukleotiden (nt) aufweisen sollte;

(3) Primer keine intramolekularen Sekundärstrukturen aufweisen sollten;

(4) intermolekulare Dimerisierung von Primern vermieden werden sollte; und

5 (5) Primer einstückig sein und keine Abbruchprodukte enthalten sollten.

Zusätzlich zu den vorstehend genannten Punkten (1) bis (5) gilt für Primer, die bei der Polymerase Chain Reaction (PCR) eingesetzt werden, daß

10 (6) falls der Primer eine überwiegend GC-reiche Sequenz enthalten sollte, eine AT-reiche Sequenz an sein 5'-Ende angehängt werden sollte, und, falls umgekehrt, der Primer eine überwiegend AT-reiche Sequenz enthalten sollte, an sein 5'-Ende eine GC-reiche Sequenz angehängt werden sollte.

15 Zusätzlich zu den vorstehend genannten Punkten (1) bis (5) gilt für den hybridisierenden Anteil von Primern für die NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), daß

(6*) die Base am 3'-Ende ein Adenin sein sollte und

20 (7) die ersten 10 bis 12 Basen, die dem T7 RNA-Polymerase-Promotor folgen, keine Sequenzfolgen enthalten sollen, die aus mehr als zwei direkt aufeinanderfolgenden Pyrimidinen bestehen.

Die vorgenannten Aussagen gelten sowohl für primäre Primer P1 als auch für P2.

25 Ein Nachteil von sequenzspezifisch gestarteten Nukleinsäure-Synthesereaktionen, welche DNA-Polymerasen oder enzymatischen Reaktionen verwenden, die sequenzspezifisch gestartete Nukleinsäure-Synthesereaktionen unter Verwendung von Enzymen, wie z.B. Polymerasen oder Ligasen, als Schlüsselreaktion enthalten, ist die Primer-abhängige Spezifität, die Primer-abhängige Sensitivität, und der Primer-abhängige Anteil an Sekundär- und Hintergrundsignalen. So kann z.B. beobachtet werden, daß bei
30 einigen isothermalen Nukleinsäure-Amplifikations-Reaktionen der Anteil an Sekundärprodukten deutlich überwiegt bis hin zum totalen Verlust des spezifi-

schen Signals. In den meisten Fällen hängt bei optimierten Reaktionsbedingungen eine niedrige Sensitivität von einer nicht effizienten oder unspezifischen Primer-Hybridisierung an die Zielsequenz ab. Reduzierte Sequenzspezifität der Primer-Hybridisierung erhöht die Bildung von amplifizierbaren unspezifischen Produkten, die wiederum die Amplifikation der spezifischen Zielsequenz reduziert oder ganz verhindert (kompetitive Reaktion). Aufgrund des isothermalen Charakters einer Primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthese kann die Spezifität und Effizienz der Primer-Hybridisierung praktisch nicht durch Temperaturänderung beeinflusst werden. Aus diesem Grund ist eine Selektion für bestimmte Primer-Sequenzen zum Zwecke von sequenzspezifisch gestarteten Primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthesereaktion unter Verwendung von Enzymen, wie beispielsweise Polymerasen oder Ligasen, oder zum Zwecke von enzymatischen Reaktion, die sequenzspezifisch gestartete Primer-abhängige Nukleinsäure-Synthesereaktionen unter Verwendung von Enzymen, z.B. Polymerasen oder Ligasen, als Schlüsselreaktion enthalten, essentiell für sensitive und spezifische Reaktionen.

Aus der US-A-5 409 818 ist ein Verfahren zur Amplifikation einer spezifischen Nukleinsäuresequenz bekannt. Das Verfahren umfaßt die Synthese einzelsträngiger RNA, einzelsträngiger DNA und doppelsträngiger DNA. Die einzelsträngige RNA dient als Matritze für einen ersten Primer, die einzelsträngige DNA ist eine zweite Matritze für einen zweiten Primer und die doppelsträngige DNA ist eine dritte Matritze für die Synthese einer Vielzahl von Kopien der ersten Matritze. Eine Sequenz des ersten oder zweiten Primers ist komplementär zu einer Sequenz der spezifischen Nukleinsäure und eine Sequenz des ersten oder zweiten Primers ist homolog zu einer Sequenz der spezifischen Nukleinsäure. Das in der US-A 5 409 818 beschriebene Amplifikationsverfahren kann dazu verwendet werden, um die Menge der spezifischen Nukleinsäuresequenz zu vermehren um dadurch den Nachweis der spezifischen Nukleinsäuresequenz zu ermöglichen, oder als Alternative zu herkömmlichen Klonierungsmethoden, um die Reinheit der spezifischen Nukleinsäuresequenz zu erhöhen.

Ein ähnliches Verfahren beschreibt auch die US-A-5 554 517.

In der WO 99/24454 werden bestimmte Primer für den Einsatz in der Polymerase-Kettenreaktion bei hohen Temperaturen (Denaturierung bei 95°C, Nukleinsäure-Synthese bei 72°C) beschrieben.

5

In der US-A-5 762 939 werden ebenfalls bestimmte Primer für den Einsatz in der Polymerase-Kettenreaktion bei hohen Temperaturen (Denaturierung bei 94°C, Nukleinsäure-Synthese bei 72°C) beschrieben.

- 10 Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Primer anzugeben, deren hybridisierender Anteil derart aufgebaut ist, daß er mit sehr großer Spezifität und Effizienz an die Zielnukleinsäure bindet sowie die Verwendung derartiger Primer in sequenzspezifisch gestarteten, Primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthesereaktionen und Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, insbesondere isothermale Amplifikationsverfahren.
- 15

Diese Aufgabe löst die Erfindung durch den unabhängigen Patentansprüchen definierten Gegenstände. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen, Aspekte und Details der Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Beispielen und der Zeichnung angegeben.

20

Die vorliegende Erfindung hat Primer zum Gegenstand, die insbesondere bei isothermalen, primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen oder isothermalen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren einsetzbar sind.

25

Unter isothermalen, primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen sollen hier Prozesse verstanden werden, bei denen die Temperatur während der Synthese um weniger als $\pm 10^\circ\text{C}$, vorzugsweise weniger als $\pm 5^\circ\text{C}$ schwankt.

- 30 Unter isothermalen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren sollen hier Verfahren verstanden werden, bei denen die Temperatur über mehrere Amplifikationsrunden um weniger als $\pm 10^\circ\text{C}$, vorzugsweise weniger als $\pm 5^\circ\text{C}$ schwankt, d.h. insbesondere Verfahren, bei denen zwischen zwei Amplifikationsrunden die

Temperatur um weniger als 10°C, vorzugsweise um weniger als 5°C angehoben wird. Typischerweise laufen solche isothermalen Amplifikationsverfahren wie z.B. NASBA über eine Vielzahl von Amplifikationsrunden bei im wesentlichen konstanter Temperatur ab, d.h. ohne dass die Temperatur wie z.B. bei der
5 PCR zyklisch signifikant erhöht oder erniedrigt wird.

Die erfindungsgemäßen Primer zeichnen sich dadurch aus, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, in den letzten sechs Basen vor dem 3'-
10 Ende im hybridisierenden Teil des Primers mindestens 50% ausmacht und der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende im hybridisierenden Teil des Primers mindestens 60% ausmacht.

15 Dabei umfaßt der hybridisierende Teil der erfindungsgemäßen Primer 12 bis 40 Basen, vorzugsweise 15 bis 30 Basen, insbesondere 15 bis 20 Basen; ganz besonders bevorzugt sind Primer, bei denen der hybridisierende Teil aus 20 Basen aufgebaut ist.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Primer angegeben, die sich dadurch auszeichnen, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende im hybridisierenden Teil mindestens 50% ausmacht und der Anteil an Basen, die drei Was-
25 serstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende im hybridisierenden Teil mindestens 70 % ausmacht.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Primer
30 angegeben, die sich dadurch auszeichnen, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende im hybridisierenden Teil mindestens 50% ausmacht und daß der Anteil an Basen, die

drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 80% ausmacht.

- 5 Vorzugsweise zeichnen sich die erfindungsgemäßen Primer dadurch aus, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten fünf Basen vor dem 3'-Ende im hybridisierenden Teil mindestens 60% ausmacht, und daß der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 70% und insbesondere mindestens 80% ausmacht.

- 15 Daneben betrifft die vorliegende Erfindung weitere bevorzugte Primer, die sich dadurch auszeichnen, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten fünf Basen vor dem 3'-Ende im hybridisierenden Teil mindestens 80% ausmacht, und daß der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60%, vorzugsweise 70% und insbesondere mindestens 80% ausmacht.

- 25 In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Primer, die sich dadurch auszeichnen, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten vier Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils mindestens 75% ausmacht, und daß der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 70% und insbesondere mindestens 80% ausmacht.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung insbesondere die zuvor beschriebenen Primer, die sich dadurch auszeichnen, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können unter den letzten fünf Basen vor dem 3'-Ende im

5 hybridisierenden Teil mindestens 80% ausmacht und daß der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende im hybridisierenden Teil mindestens 70% ausmacht.

- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Primer, die dadurch ausgezeichnet sind, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten vier Basen vor dem 3'-Ende im hybridisierenden Teil mindestens 75%, besser 100%, ausmacht und daß der
- 15 Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende im hybridisierenden Teil mindestens 80%, besser 100%, ausmacht.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, um Adenin und/oder Thymin.

20

Die Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, sind vorzugsweise Guanin und/oder Cytosin.

25

Daneben betrifft die Erfindung ein Gemisch aus den erfindungsgemäßen Primern, ein Verfahren zur Herstellung der Primer, und die Verwendung der Primer für Primer-abhängige Nukleinsäure-Syntheseprozesse oder für Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, insbesondere isothermale Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren.

30

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch noch einen Kit für die Durchführung von Primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen oder Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, insbesondere isothermale Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, wobei der Kit die vorstehend beschriebenen Primer in einem geeigneten Behälter enthält. Daneben kann der Kit noch geeignete Puffersysteme, Enzyme, Nukleotide etc. enthalten.

Die erfindungsgemäßen Primer können mit herkömmlichen Nukleinsäure-Syntheseverfahren hergestellt und anschließend aus dem Syntheseansatz isoliert werden. Beschrieben sind diese herkömmlichen Verfahren beispielsweise in dem Buch von de la Vega und Guamos, Synthetic oligonucleotides, preparation, analysis and applications, Springer, Berlin 1996.

Intramolekulare Hybridisierung des Primers oder intermolekulare Hybridisierung zwischen verschiedenen Primern tritt nicht auf.

Nachteilig an isothermalen, Primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen und isothermalen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren ist die von den Primern einer bestimmten Zielsequenz abhängige, starke Variabilität in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und Menge an Hintergrund- und Sekundärprodukten. Der Anteil an unerwünschten Sekundärprodukten manifestiert sich häufig schon in Ansätzen, die keine Matrizen-Nukleinsäure enthalten, sondern nur das Reaktionsgemisch inklusive Primer (sog. Negativkontrolle).

Bei isothermalen, Primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen und isothermalen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren kann eine schlechte Hybridisierungsspezifität oder Hybridisierungseffizienz von Primern wegen der limitierten Hitzestabilität der beteiligten Enzyme nicht durch eine Veränderung (Erhöhung) der Primer-Hybridisierungstemperatur verbessert werden. Es muß daher bei diesen Verfahren ein besonderes Augenmerk auf die verwendeten Primer gelegt werden. Hier setzt die vorliegende Erfindung an. Die erfindungsgemäßen Primer weisen eine hohe Sensitivität und Spezifität im Hinblick auf die Primer-Bindung an eine bestimmte Zielsequenz auf. Darüber hinaus ist die Pro-

duktion unerwünschter Hintergrund- und Sekundärprodukte gegenüber bekannten Primern deutlich erniedrigt.

Die Primer-Sequenz beeinflusst Spezifität und Effizienz der Primer-

- 5 Hybridisierung mit der Ziehnukleinsäure. Dies wiederum beeinflusst die Spezifität der sequenzspezifisch gestarteten Primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthesereaktion unter Verwendung von Enzymen, wie z.B. Polymerasen oder Ligasen, oder von enzymatischen Reaktionen, die sequenzspezifisch gestartete Primer-abhängige Nukleinsäure-Synthesereaktionen unter Verwendung von
- 10 Enzymen, wie z.B. Polymerasen oder Ligasen, als Schlüsselreaktion enthalten. Eine Erhöhung der Schmelztemperatur (T_m) zwischen Ziehnukleinsäure und Primer durch die Erhöhung des GC-Gehaltes bzw. Verringerung des AT-Gehaltes der Primer-Sequenz führt zu einer Erhöhung der Primer-Hybridisierungseffizienz und zu einer Verringerung der Primer-
- 15 Hybridisierungsspezifität. Eine Verringerung des GC-Gehaltes bzw. eine Erhöhung des AT-Gehaltes der Primer-Sequenz führt dagegen zu geringerer Hybridisierungseffizienz, aber höherer Hybridisierungsspezifität zwischen Primer und Ziehnukleinsäure.
- 20 Die Primer-abhängige Nukleinsäure-Synthese durch Enzyme, wie beispielsweise RNA- oder DNA-abhängige DNA-Polymerasen, ist eine Schlüsselreaktion bei vielen DNA-Synthesereaktionen, wie z.B. cDNA-Synthese, PCR, RT/PCR und DNA-Sequenzierung, sowie isothermalen Amplifikationsreaktionen, wie z.B. NASBA, 3SR, TMA; SDA, LCR und anderen Methoden. Die Effizienz der Primer-
- 25 primer-abhängigen DNA-Synthese hängt neben vielen anderen Bedingungen von der Effizienz und Spezifität der Primer-Hybridisierung ab. Die hier aufgeführte Erfindung betrifft verbesserte Primer, welche eine erhöhte Primer-
-
- Bindungseffizienz und -Spezifität aufweisen, zum Zwecke einer verbesserten Primer-abhängigen Nukleinsäure-Synthese oder einer Verbesserung von Reak-
- 30 tionen, die eine Primer-abhängige DNA-Synthese enthalten.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich insbesondere auf den hybridisierenden Anteil der Sequenz des Primers P1 oder des P2 oder beider Primer P1 und P2

für sequenzspezifisch gestartete Primer-abhängige Nukleinsäure-Synthesereaktionen unter Verwendung von Enzymen für die Nukleinsäure-Polymerisation, wie beispielsweise DNA-Polymerasen, oder enzymatische Reaktionen, die sequenzspezifisch gestartete Primer-abhängige Nukleinsäure-Synthesereaktionen unter Verwendung von Nukleinsäure-Polymerasen, wie DNA-Polymerasen, als Schlüsselreaktion enthalten.

Die erfindungsgemässen Primer können besonders vorteilhaft in primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen oder isothermalen Amplifikationsverfahren eingesetzt werden, die bei moderaten Temperaturen ablaufen, z.B. cDNA-Synthese und NASBA. Im Gegensatz zu Primern aus dem Stand der Technik ist es bei den erfindungsgemässen Primern nicht notwendig, mangelnde Spezifität durch hohe Temperaturen zu kompensieren.

Bevorzugt werden die Primer bei Nukleinsäure-Syntheseprozessen (z.B. cDNA-Synthese) oder isothermalen Amplifikationsverfahren (z.B. NASBA) eingesetzt, die bei Temperaturen zwischen 4°C und 70°C ablaufen, bevorzugt zwischen 4°C und 65°C, besonders bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 30°C und 50 °C, insbesondere zwischen 34°C und 45°C.

20

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung der erfindungsgemässen Primer in einem Nukleinsäure-Syntheseprozess oder isothermalen Amplifikationsverfahren, wobei dieser Prozess bzw. das Verfahren in einem Temperaturbereich zwischen 4°C und 70°C abläuft, bevorzugt zwischen 4°C und 65°C, besonders bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 30°C und 50 °C, insbesondere zwischen 34°C und 45°C.

25

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur primer-abhängigen Synthese von Nukleinsäure, bei dem

30

(a) wenigstens ein Primer, eine nukleinsäurehaltige Probe, die eine Zielnukleinsäure enthalten kann, eine Nukleinsäure-Polymerase sowie geeignete Nukleotide oder eine Ligase gemischt werden, wobei der Primer dadurch ge-

kennzeichnet ist, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 50% beträgt und der Anteil an Basen, die
5 drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60% beträgt;

(b) die Mischung bei einer Temperatur von 4°C bis 70°C, bevorzugt zwischen
10 4°C und 65°C, besonders bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 30°C und 50 °C, insbesondere zwischen 34°C und 45°C, sowie unter ansonsten geeigneten Bedingungen so inkubiert wird, dass Nukleinsäure-Synthese stattfindet, wenn Zielnukleinsäure in der Probe enthalten ist.

15 Die Nukleinsäure-Polymerase oder Ligase hat dabei eine primer-abhängige Aktivität und die Zielnukleinsäure ist ein geeignetes Substrat dieser Nukleinsäure-Polymerase oder Ligase. Unter geeigneten Bedingungen ist dabei in der Regel ein wässriges, vorzugsweise in einem geeigneten pH-Bereich gepuffertes
20 Milieu sowie erforderlichenfalls die Anwesenheit weiterer Komponenten (z.B. anorganische Salze, Betain, Serumalbumin etc.) zu verstehen. Die Temperatur ist dabei zweckmässigerweise dem Aktivitätsoptimum des verwendeten Enzyms angepasst.

25 Unter nukleinsäurehaltiger Probe ist jede Probe oder Präparation zu verstehen, die Nukleinsäure enthält. Dies kann eine komplexe biologische Probe sein, die eine Vielzahl verschiedener Nukleinsäuremoleküle und darüber hinaus weitere
30 Substanzen enthält, oder ein Nukleinsäuregemisch, das von nicht-Nukleinsäuren ganz oder weitgehend gereinigt wurde, oder ein Nukleinsäuregemisch, das nur einen bestimmten Typ von Nukleinsäure enthält (z.B. ein Gemisch von mRNA-Molekülen), die Probe kann aber auch nur eine einzige gereinigte Nukleinsäure enthalten. Das Verfahren kann dazu dienen, festzustellen, ob eine bestimmte Nukleinsäure in der Probe enthalten ist, und/oder in welcher

Menge sie in der Probe enthalten ist. Das Verfahren kann auch dazu dienen, Informationen über die Struktur einer in der Probe enthaltenen Nukleinsäure zu erhalten, z.B. Sequenzinformationen, oder auch, um Material (Nukleinsäure) für andere Applikationen herzustellen.

5

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur primer-abhängigen Synthese von Nukleinsäure, bei dem

- (a) wenigstens ein Primer nach an sich bekannten Methoden hergestellt wird, der dadurch gekennzeichnet ist, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 50% beträgt und der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60% beträgt;
- (b) dieser oder die Primer, sowie wenigstens eine nukleinsäurehaltige Probe, die eine Zielnukleinsäure enthalten kann, eine Nukleinsäure-Polymerase sowie geeignete Nukleotide oder eine Ligase gemischt werden;
- (c) die Mischung bei einer Temperatur von 4°C bis 70°C, bevorzugt zwischen 4°C und 65°C, besonders bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 30°C und 50°C, insbesondere zwischen 34°C und 45°C, sowie unter ansonsten geeigneten Bedingungen so inkubiert wird, dass Nukleinsäure-Synthese stattfindet, wenn die Probe Zielnukleinsäure enthält.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäure, bei dem

- (a) wenigstens ein Primer, eine nukleinsäurehaltige Probe, die eine Zielnukleinsäure enthalten kann, eine Nukleinsäure-Polymerase oder Ligase, erforder-

lichenfalls geeignete Nukleotide sowie erforderlichenfalls weitere Komponenten gemischt werden, wobei der Primer dadurch gekennzeichnet ist, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, unter den
5 letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 50% beträgt und der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60% beträgt;

10 (b) die Mischung bei einer Temperatur von 4°C bis 70°C, bevorzugt zwischen 4°C und 65°C, besonders bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 30°C und 50°C, insbesondere zwischen 34°C und 45°C, sowie unter ansonsten geeigneten Bedingungen so inkubiert wird,
15 dass Nukleinsäure-Amplifikation stattfindet, wenn die Probe Zielnukleinsäure enthält.

Weitere Komponenten können beispielsweise weitere Enzyme sein, im Falle der NASBA-Reaktion neben der reversen Transkriptase etwa T7-RNA-
20 Polymerase und RNase H. Die Mischung wird zur Amplifikation vorzugsweise unter isothermalen Bedingungen inkubiert. Dabei schliesst das erfindungsgemässe Verfahren nicht aus, dass vor und nach dem eigentlichen Amplifikationsabschnitt des Verfahrens Temperaturen eingestellt werden, die nicht in diesem Sinne isotherm sind. So können Komponenten etwa bei 4° oder Raum-
25 temperatur gemischt und erst anschliessend auf die für die Amplifikation geeignete Temperatur gebracht werden, oder nach Mischung von Zielnukleinsäure und Primer, aber vor Zugabe der Nukleinsäure-Polymerase können z.B. zur
Denaturierung zeitweise höhere Temperaturen eingestellt und dann vor der Zugabe des Enzyms erniedrigt werden. Gemeint sind hier isotherme Bedingungen
30 während des Amplifikationsabschnittes des Verfahrens. Dabei ist unter Amplifikationsabschnitt der Abschnitt des Verfahrens zu verstehen, in dem Nukleinsäure-Synthese zyklisch wiederholt stattfindet und die Zahl der neu gebildeten Nukleinsäuremoleküle mit der Zeit ansteigt, z.B. linear oder exponentiell. Be-

finden sich zwischen den einzelnen Zyklen, in denen Nukleinsäuresynthese stattfindet, Intervalle, in denen keine Nukleinsäuresynthese stattfindet, gehören diese Intervalle zum Amplifikationsabschnitt dazu.

5 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäure, bei dem

(a) wenigstens ein Primer nach an sich bekannten Methoden hergestellt wird, der dadurch gekennzeichnet ist, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 50% beträgt und der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60% beträgt;

(b) der oder die Primer, wenigstens eine nukleinsäurehaltige Probe, die eine Zielnukleinsäure enthalten kann, eine Nukleinsäure-Polymerase oder Ligase, erforderlichenfalls geeignete Nukleotide sowie erforderlichenfalls weitere Komponenten gemischt werden;

(c) die Mischung bei einer Temperatur von 4°C bis 70°C, bevorzugt zwischen 4°C und 65°C, besonders bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 30°C und 50 °C, insbesondere zwischen 34°C und 45°C, sowie unter ansonsten geeigneten Bedingungen so inkubiert wird, dass Nukleinsäure-Amplifikation stattfindet, wenn die Probe Zielnukleinsäure enthält.

Die Mischung wird zur Amplifikation vorzugsweise unter isothermalen Bedingungen inkubiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Kit für die Durchführung von Primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen oder Nukleinsäure-

Amplifikationsverfahren, insbesondere isothermale Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, wobei der Kit einen oder mehrere der vorstehend beschriebenen Primer in einem geeigneten Behälter sowie Instruktionen in schriftlicher, bildlicher oder elektronischer Form (einschliesslich eines Verweises auf eine entsprechende Internet-Seite) zur Ausführung eines Nukleinsäure-Syntheseprozesses oder eines Nukleinsäure-Amplifikationsverfahrens enthält, wobei bei dem Prozess oder Verfahren die Nukleinsäure-Synthese bei einer Temperatur von 4°C bis 70°C, bevorzugt zwischen 4°C und 65°C, besonders bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 30°C und 50 °C, insbesondere zwischen 34°C und 45°C ablaufen soll. Daneben kann der Kit noch geeignete Puffersysteme, Enzyme, Nukleotide etc. enthalten.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen und der Beispiele näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 bis 5 Agarosegele, welche die Auftrennung von mit bekannten und erfindungsgemäßen Primern hergestellten Amplifikationsprodukten zeigen.

Die erfindungsgemäßen Primer sind besonders wirksam, wenn sie weder mit sich selbst hybridisieren (intramolekulare Hybridisierung) noch bei Einsatz mehrerer Primer untereinander hybridisieren (intermolekulare Hybridisierung).

Wie bereits mehrfach erwähnt eignen sich die erfindungsgemäßen Primer insbesondere für den Einsatz bei isothermalen, Primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen, wie DNA-Syntheseprozessen, sowie bei isothermalen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren.

Um die Überlegenheit der neuen, erfindungsgemäßen Primer gegenüber herkömmlichen Primern zu demonstrieren wurden diese unter ansonsten vergleichbaren Bedingungen in einem isothermalen Amplifikationsverfahren (NAS-BA, Nucleic Acid Sequence Based Amplification) getestet. Die Ergebnisse die-

ser Tests sind in den nachfolgenden Beispielen dargelegt sowie in den Fig. 1 bis 5 dargestellt.

Es wurde eine Reihe von Primer-Paaren (Primer P1 und Primer P2) und Zielnu-
5 kleinsäuren getestet, wobei hauptsächlich nur ein Primer, nämlich Primer P1, in
seinem Primer Design vergleichend zwischen bekannten und erfindungsgemä-
ßen Primer Design Regeln getestet wurde.

Der NASBA-Ansatz in den Beispielen wurde folgendermaßen durchgeführt. Die
10 Reagenzien (Puffer, Nukleotide, Salze) wurden zusammen mit Wasser, Primer
P1, Primer P2 und RNA bei 65°C für 5 min inkubiert und dann für 5 min auf
41°C abgekühlt. Anschließend wurde ein Gemisch aus den Enzymen T7-RNA-
Polymerase, RNase H und Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die Reaktion
erfolgte dann für 90 min bei 41°C. Die entstandenen Reaktionsprodukte wurden
15 anschließend auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die
Konzentration der Gele 1 bis 1,2%-ig war. Die Spezifität der Produkte wurde
durch Standardverfahren verifiziert. Unter Standardverfahren sind insbesondere
die Größenbestimmung der entstehenden Fragmente im Agarosegel sowie die
Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde, Blotting-Verfahren und Hybridisie-
20 rungsbedingungen nach Sambrook, J., Fritsch E. F., Maniatis T., Molecular
Cloning: A Laboratory Manual; 2nd Edition; Cold Spring Harbour Laboratory;
Cold Spring Harbour; NY, 1989; zu verstehen. Sowohl der Laufpuffer als auch
der Gelpuffer waren 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer). Die angelegte
Spannung betrug 4 V/cm, und die Elektrophoresen dauerten 30 bis 45 min.

25 Die zu vergleichenden bekannten und erfindungsgemäßen Primer wurden häu-
fig aus derselben Primer-Bindungsregion hergestellt, wobei sich beide Primer-
bindestellen der Primer (bekannte und erfindungsgemäße Primer) in der Regel
überlappten. Dabei zeigte sich, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen
30 Primer im Vergleich zu herkömmlichen Primern der Anteil an Hintergrundsignal
reduziert ist, das Signal/Rausch-Verhältnis und die Sensitivität erhöht sind und
stärkere Signale beobachtet werden.

Beispiele

5 Beispiel 1

Dieses Beispiel betrifft die NASBA-Amplifikation eines Amplikons aus der NF-
kB-mRNA. Verglichen wurden die vier Primer A, B, C und D (siehe Tabelle 1) ,
10 wobei die Primer A und B herkömmlicher Art waren und die Primer C und D
erfindungsgemäße Ausführungsformen darstellen.

Primer A hat AT-reiche 3'- und 5'-Enden und T als terminale Base am 3'-Ende.
Primer B hat ebenfalls AT-reiche 3'- und 5'-Enden, allerdings ein C als termi-
15 nale Base am 3'-Ende.

Die beiden erfindungsgemäßen Primer C und D zeigen ein GC-reiches 5'-Ende
und ein AT-reiches 3'-Ende. Primer C enthält ein A als terminale Base am 3'-
Ende, während Primer D ein T als terminale 3'-Base aufweist.

20

Die genauen Primersequenzen sind in Tabelle 1 angegeben.

Fig. 1 zeigt Agarosegele, auf denen die Amplifikationsprodukte der mit den her-
kömmlichen und den erfindungsgemäßen Primern behandelten Ansätze aufge-
25 trennt sind.

Die Spuren 1 bis 5 für die einzelnen Primer A bis D repräsentieren jeweils un-
terschiedliche Mengen an RNA, die zur NASBA-Reaktion eingesetzt wurden.
Spur 1 betrifft den Ansatz mit 330 ng, Spur 2 den mit 20 ng, Spur 3 den mit 1,3
30 ng, Spur 4 den mit 0,08 ng und Spur 5 den mit 0 ng. M bezeichnet die Größen-
markerspur.

Das gewünschte (spezifische) Produkt ist in Fig. 1 mit einem Pfeil markiert. Man erkennt deutlich, daß mit den Primern A und B neben den spezifischen in erheblichem Ausmaß unspezifische Amplifikationsprodukte gebildet wurden, während mit den erfindungsgemäßen Primern C und D die Ausbeute an spezifischen Produkten deutlich höher war und die Bildung unerwünschter Nebenprodukte weitestgehend unterblieb. Somit ist mit den erfindungsgemäßen Primern sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität im Vergleich zu herkömmlichen Primern signifikant verbessert.

TABELLE 1

Primer	Erfindungsgemäß	Sequenz
A	nein	AAACACCATGGTGGGAAACT
B	nein	AACACCATGGTGGGAAACTC
C	ja	GGTCGGTGGGTCCGCTGAAA
D	ja	GAGCGGGAAGGCACAGCAAT

Vergleichsbeispiel

Auch dieses Beispiel betrifft die NASBA-Amplifikation eines Amplikons aus der NF- κ B-mRNA. Verglichen wurden ausschließlich Primer, die nicht nach den erfindungsgemäßen Vorgaben zusammengestellt wurden.

Die Primer A, B, C und D (siehe Tabelle 2) weisen in Umkehrung der Merkmale der neuen, erfindungsgemäßen Primer anstelle eines AT-reichen 3'-Endes und eines GC-reichen 5'-Endes ein GC-reiches 3'-Endes und ein AT-reiches 5'-Ende auf. Primer E und F dagegen zeigen zwar ein AT-reiches 3'-Ende, aber auch ein AT-reiches 5'-Ende. Die Primer A und B zeigen ein G als 3'-terminale Base, die Primer C, D und E weisen ein A als 3'-terminale Base auf und Primer

F trägt ein C als 3'-terminale Base. Der GC-Gehalt des hybridisierenden Teils aller Primer ist größer oder gleich 50%.

Die genauen Primersequenzen sind in Tabelle 2 gezeigt.

5

In den Spuren 1 bis 5 des in Fig. 2 gezeigten Agarosegels sind unterschiedliche Mengen an Gesamt-RNA (1 = 330 ng; 2 = 20 ng; 3 = 1,3 ng; 4 = 0,08 ng und 5 = 0 ng) zur NASBA-Reaktion eingesetzt worden. M ist die Größenmarkerspur. Die spezifische Produktgröße ist mit einem Pfeil markiert.

10

Man erkennt deutlich, daß mit bisher verwendeten Primern oder bei Umkehrung der erfindungsgemäß angegebenen Primer Design Regel Sensitivität und Spezifität signifikant herabgesetzt sind.

15 **TABELLE 2**

Primer	Erfindungsgemäß	Sequenz
A	nein	AGAAGGAAACACCATGGTGG
B	nein	GAAGGAAACACCATGGTGGG
20 C	nein	AAGGAAACACCATGGTGGGA
D	nein	AGGAAACACCATGGTGGGAA
E	nein	GGAAACACCATGGTGGGAAA
F	nein	GAAACACCATGGTGGGAAAC

25

Beispiel 2

30 Dieses Beispiel betrifft die NASBA-Amplifikation eines Amplikons aus der IL-1 alpha-mRNA. Verglichen wurden, wie in Fig. 3 gezeigt, Amplifikationsprodukte, die mit herkömmlichen Primern hergestellt wurden (die unter Ziffer 1 angegebenen Spuren) mit entsprechenden Produkten, bei deren Herstellung auf die neuen, erfindungsgemäßen Primer zurückgegriffen wurde (Spuren, die unter den

Ziffern 2 und 3 zu sehen sind). Die unter Ziffer 4 angegebenen Spuren sind Negativkontrollen; M ist die Größenmarkerspur.

Tabelle 3 gibt die genauen Primersequenzen wieder.

5

Die spezifische Produktgröße ist in dem in Fig. 3 gezeigten Agarosegel mit einem Pfeil markiert. Man erkennt deutlich, daß mit herkömmlichen Primern neben spezifischen Produkten in erheblichem Ausmaß auch unerwünschte, unspezifische Amplifikationsprodukte gebildet werden. Nur beim Einsatz von erfindungsgemäßen Primern findet man praktisch ohne störenden Hintergrund das spezifische, gewünschte Amplifikationsprodukt.

10

TABELLE 3

15

Primer	Erfindungsgemäß	Sequenz
1	nein	GATTGAGGGCGTCATTCAGGA
2	ja	GAGGGCGTCATTCAGGATGA
3	ja	AGGGCGTCATTCAGGATGAA

20

Beispiel 3

In diesem Beispiel wird die NASBA-Amplifikation eines Amplikons aus der IL10-mRNA beschrieben. Bei dem in Fig. 4 gezeigten Agarosegel sind die mit herkömmlichen Primern erhaltenen Amplifikationsprodukte auf den Spuren 1 und 2 gezeigt, während die mit dem neuen, erfindungsgemäßen Primer gewonnenen Produkte auf die unter Ziffer 3 dargestellten Spuren aufgetragen wurden.* Die Spuren unter Ziffer 4 sind Negativkontrollen, und M ist wieder die Größenmarkerspur. Die spezifische Produktgröße ist in Fig. 4 mit einem Pfeil markiert.

25

30

Die exakten Primersequenzen sind in Tabelle 4 angegeben.

Man kann deutlich erkennen, daß mit den herkömmlichen Primern praktisch nur unspezifische Amplifikationsprodukte gebildet wurden, während mit dem erfindungsgemäßen Primer größtenteils das spezifische Amplifikationsprodukt erhalten wird.

5

TABELLE 4

10	Primer	Erfindungsgemäß	Sequenz
	1	nein	AAGCTTCTGTTGGCTCCCCA
	2	nein	TGTTGGCTCCCCAAAGAACA
	3	ja	GCTTCTGTTGGCTCCCCAAA

15

Beispiel 4

In diesem Beispiel wird die NASBA-Amplifikation eines Amplikons aus der c-fos-mRNA gezeigt. Das Ergebnis ist in Fig. 5 dargestellt. Aufgetragen wurden dort mit herkömmlichen Primern gewonnene Amplifikationsprodukte (Spuren A1 und A2 sowie B1 und B2) mit den Produkten, bei denen die neuen, erfindungsgemäßen Primer (Spuren C1 und C2) eingesetzt wurden. Die drei Spuren N sind Negativkontrollen; M ist wieder die Größenmarkerspur. Die spezifische Produktgröße ist mit einem Pfeil markiert.

25

Die Sequenzen der in diesem Beispiel eingesetzten Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Man erkennt deutlich, daß bei einem schwach exprimierten Gen mit herkömmlichen Primern nur unspezifische Amplifikationsprodukte gebildet werden. Nur mit erfindungsgemäßen Primern erhält man das spezifische Amplifikationsprodukt in erheblicher Ausbeute (siehe insbesondere Spur C2).

30

TABELLE 5

	Primer	Erfindungsgemäß	Sequenz
5	A	nein	GAAGACGTGTAAGCAGTGCA
	B	nein	TAGGTGAAGACGAAGGAAGA
	C	ja	AGACGAAGGAAGACGTGTAA

Die Ergebnisse der vorstehenden Beispiele zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine Vielzahl von herkömmlichen und erfindungsgemäßen Primern auf ihre Fähigkeit hin untersucht wurde, spezifische Amplifikationsprodukte zu bilden bzw. die Bildung unerwünschter Nebenprodukte möglichst weitgehend zu unterdrücken. Dabei fiel auf, daß herkömmliche Primer in sehr viel größerem Ausmaß dazu neigen, unspezifische Nebenprodukte, unscharfe Banden oder falsch positive Ergebnisse, d.h. Produkte mit falscher Größe, zu bilden, während bei Verwendung von erfindungsgemäßen Primern praktisch immer eine erhebliche Ausbeute an spezifischem Amplifikationsprodukt erhalten werden konnte.

Setzt man die Anzahl von Reaktionen B, die zu Hintergrund-Signalen führen, ins Verhältnis zu der Anzahl an Reaktionen O, die zu keinem Hintergrund-Signal führen, erhält man folgendes Ergebnis:

	Verhältnis B/O
25	Herkömmliche Primer 1,25
	Erfindungsgemäße Primer 0,86

Dies bedeutet, daß bei Verwendung herkömmlicher Primer mehr als 45% mehr Hintergrund-Signale und damit unspezifische Produkte auftreten als bei Einsatz der neuen, erfindungsgemäßen Primer. Die vorstehend angegebene Berechnung bezieht sich auf alle in der vorliegenden Anmeldung angegebenen Beispiele sowie auf weitere untersuchte, nicht näher aufgeführte Primer.

Die neuen, erfindungsgemäßen Primer ermöglichen somit eine höhere Ausbeute an spezifischem Produkt bei reduziertem Hintergrundsignal (reduzierte Menge an Hintergrund- und Sekundärprodukten). Dies geht zurück auf eine hohe Spezifität und Sensitivität der erfindungsgemäßen Primer in Bezug auf die verwendeten Matrizen, was diese Primer besonders geeignet macht zum Einsatz bei isothermalen, Primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen und isothermalen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, bei denen die Bindung des Primers an die Matrize nicht durch eine Temperaturänderung beeinflusst werden kann.

Beispiel 5

Diese Beispiel betrifft eine Reaktion mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase). Wie oben angeführt, bestimmen zwei Parameter das Priming von Nukleinsäuresynthese-Prozessen: zum einen die Spezifität und zum anderen die Effizienz. Beide Parameter des Priming lassen sich bei Reverse-Transkriptase Reaktionen durch eine anschließende PCR bestimmen: Die Effizienz des Priming kann bestimmt werden durch die Amplifikation spezifischer Sequenzen, d.h. der Sequenzen, die geprimt wurden. In diesem Fall würde ein starkes Signal (nach der PCR) einem effizienten Priming bei der Reverse-Transkriptase Reaktion entsprechen. Die Spezifität des Priming hingegen läßt sich durch die Amplifikation von Sequenzen, die eigentlich nicht geprimt werden dürfen, bestimmen. In diesem Fall würde ein schwaches Signal nach PCR einem spezifischen Priming bei der Reverse-Transkriptase Reaktion entsprechen.

Spezifität und Effizienz des Priming bei der Reverse-Transkriptase Reaktion wurde mit erfindungsgemäßen (A: GGA GGA GCA ATG ATC TTG A und C: GGG TCG GTG GGT CCG CTG AA) und herkömmlichen (B: GTC TCA AGT CAG TGT ACA GG und D: AGA AGG AAA CAC CAT GGT GG) Primern bei den Transkripten β -Aktin (A und B) und NF- κ B (C und D) bestimmt. Dazu wurden Reverse-Transkriptase Reaktionen mit Total-RNA aus Hela-Zellen mit den

benannten Primern und der Reverse Transkriptase Omniscript® (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die PCR zur Bestimmung der Effizienz (Fig. 6) wurde mit den Transkript-spezifischen Primern von β -Aktin (β act11: GGA GGA GCA ATG ATC TTG A ; β act12: GTC CTG TGG CAT CCA CGA AA) und NF-kB (p65.2: GCC TTC CGA CCG GGA GCT CA; p65.7: GGG TCG GTG GGT CCG CTG AA) in einem 20 μ l Ansatz durchgeführt. Die PCR zur Bestimmung der Spezifität wurde mit Primern durchgeführt, die spezifisch Sequenzen der 28S rRNA amplifizieren (28S1: CTC AGT AAC GGC GAG TGA AC; 28S2: GTA CTT GTT GAC TAT CGG TC) (Fig. 7).

Durch das stärkere Amplifikationsignal bei der Amplifikation des spezifischen Priming-Produktes mit den erfindungsgemäßen Primern in Figur 6 erkennt man deutlich die höhere Effizienz des Primings bei den erfindungsgemäßen Primern. Auf der anderen Seite läßt sich eine höhere Priming-Spezifität durch die geringere Signalintensität bei der Amplifikation des unspezifischen Priming-Produktes mit den erfindungsgemäßen Primern in Figur 7 erkennen. Darüberhinaus findet man Sekundärprodukte, wenn das Priming der Reverse-Transkriptase Reaktion mit den herkömmlichen Primern stattfand (Figur 6, Primer B und D). Diese unerwünschten Nebenprodukte wurden bei Reverse-Transkriptase-Reaktionen mit den erfindungsgemäßen Primern nicht beobachtet.

Somit ist mit den erfindungsgemäßen Primern sowohl Priming-Effizienz wie auch -Spezifität im Vergleich zu herkömmlichen Primern signifikant verbessert.

Patentansprüche

- 5 1. Primer, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 50% beträgt und
- 10 der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60% beträgt.
- 15 2. Primer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten vier Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 75%, vorzugsweise 100%, ausmacht, und daß der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen im Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende im hybridisierenden Teil mindestens 80%, vorzugsweise 100%, ausmacht.
- 20 3. Gemisch aus mindestens zwei Primern gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer derart aufgebaut sind, daß
- 25 keine intermolekulare und/oder intramolekulare Wechselwirkung auftritt.
4. Verfahren zur Herstellung eines Primers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Primer nach an sich bekannten Verfahren herstellt und isoliert.

5. Verwendung eines Primers oder mehrerer Primer gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 oder des Gemischs aus Primern gemäß Anspruch 3 für einen primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozess.
- 5 6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass dieser Prozess in einem Temperaturbereich zwischen 4°C und 70°C abläuft, bevorzugt zwischen 20°C und 50°C.
- 10 7. Verwendung eines Primers oder mehrerer Primer gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 oder des Gemischs aus Primern gemäß Anspruch 3 für ein Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren.
- 15 8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure-Synthese in diesem Verfahren in einem Temperaturbereich zwischen 4°C und 70°C abläuft, bevorzugt zwischen 20°C und 50°C.
- 20 9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Amplifikationsabschnitt des Verfahrens unter isothermalen Bedingungen abläuft.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das isothermale Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren eine Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) ist.
- 25 11. Verfahren zur primer-abhängigen Synthese von Nukleinsäure, bei dem
 - (a) wenigstens ein Primer, eine nukleinsäurehaltige Probe, die eine Zielnukleinsäure enthalten kann, eine Nukleinsäure-Polymerase oder eine Ligase sowie erforderlichenfalls geeignete Nukleotide gemischt werden, wobei der Primer dadurch gekennzeichnet ist, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers minde-

stens 50% beträgt und der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60% beträgt;

5

- (b) die Mischung bei einer Temperatur von 4°C bis 70°C, bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, sowie unter ansonsten geeigneten Bedingungen so inkubiert wird, dass Nukleinsäure-Synthese stattfindet, wenn Zielnukleinsäure in der Probe enthalten ist.

10

12. Verfahren zur primer-abhängigen Synthese von Nukleinsäure, bei dem

- (a) wenigstens ein Primer nach an sich bekannten Methoden hergestellt wird, der dadurch gekennzeichnet ist, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 50% beträgt und der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60% beträgt;

15

20

- (b) dieser oder die Primer, sowie wenigstens , eine nukleinsäurehaltige Probe, die eine Zielnukleinsäure enthalten kann, eine Nukleinsäure-Polymerase oder eine Ligase sowie erforderlichenfalls geeignete Nukleotide gemischt werden;

25

- (c) die Mischung bei einer Temperatur von 4°C bis 70°C, bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, sowie unter ansonsten geeigneten Bedingungen so inkubiert wird, dass Nukleinsäure-Synthese stattfindet, wenn Zielnukleinsäure in der Probe enthalten ist.

30

13. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäure, bei dem

(a) wenigstens ein Primer, eine nukleinsäurehaltige Probe, die eine Zielnukleinsäure enthalten kann, eine Nukleinsäure-Polymerase oder eine Ligase, erforderlichenfalls geeignete Nukleotide sowie erforderlichenfalls weitere Komponenten gemischt werden, wobei der Primer dadurch gekennzeichnet ist, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 50% beträgt und der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60% beträgt;

(b) die Mischung bei einer Temperatur von 4°C bis 70°C, bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, sowie unter ansonsten geeigneten Bedingungen so inkubiert wird, dass Nukleinsäure-Amplifikation stattfindet, wenn Zielnukleinsäure in der Probe enthalten ist.

14. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäure, bei dem

(a) wenigstens ein Primer nach an sich bekannten Methoden hergestellt wird, der dadurch gekennzeichnet ist, daß der Anteil an Basen, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können, unter den letzten sechs Basen vor dem 3'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 50% beträgt und der Anteil an Basen, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können, im letzten Viertel vor dem 5'-Ende des hybridisierenden Teils des Primers mindestens 60% beträgt;

(b) der oder die Primer, wenigstens eine nukleinsäurehaltige Probe, die eine Zielnukleinsäure enthalten kann, eine Nukleinsäure-Polymerase oder Ligase, erforderlichenfalls geeignete Nukleotide sowie erforderlichenfalls weitere Komponenten gemischt werden;

5

(c) die Mischung bei einer Temperatur von 4°C bis 70°C, bevorzugt zwischen 20°C und 50°C, sowie unter ansonsten geeigneten Bedingungen so inkubiert wird, dass Nukleinsäure-Amplifikation stattfindet, wenn Zielnukleinsäure in der Probe enthalten ist.

10

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt (b) in Anspruch 13 oder Schritt (c) in Anspruch 14 unter isothermalen Bedingungen ablaufen.

15 16. Kit für Primer-abhängige Nukleinsäure-Syntheseprozesse oder Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, wobei der Kit mindestens einen Primer gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 oder ein Gemisch aus Primern gemäß Anspruch 3 in einem geeigneten Behälter enthält.

20 17. Kit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass er zusätzlich Instruktionen in schriftlicher, bildlicher oder elektronischer Form (einschliesslich eines Verweises auf eine entsprechende Internet-Seite) zur Ausführung eines Nukleinsäure-Syntheseprozesses oder eines Nukleinsäure-Amplifikationsverfahrens enthält, wobei bei dem Prozess oder Verfahren
25 die Nukleinsäure-Synthese bei einer Temperatur von 4°C bis 70°C, bevorzugt zwischen 20°C und 50°C ablaufen soll.

1/3

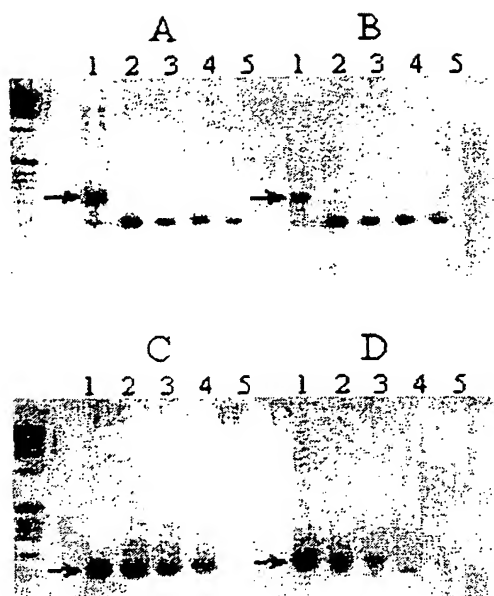


Fig 1

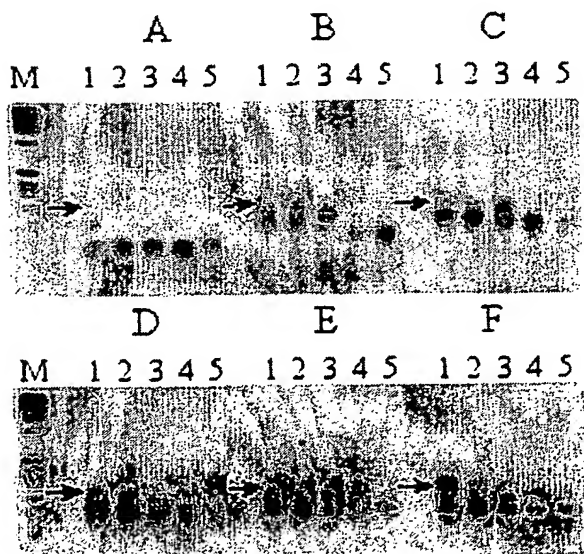


Fig 2

2/3

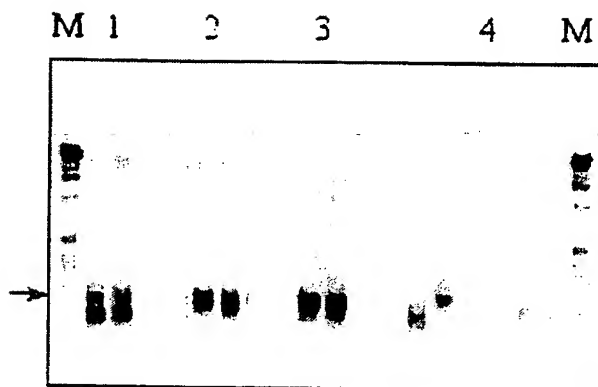


Fig 3

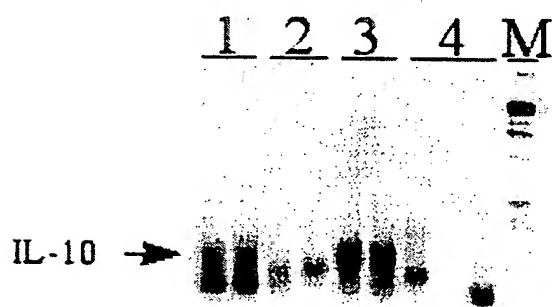


Fig4

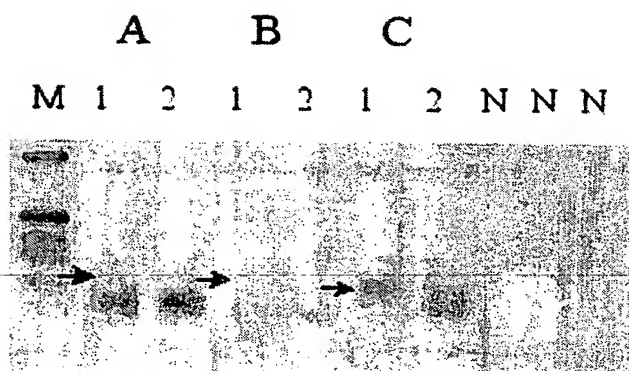


Fig.5

3/3

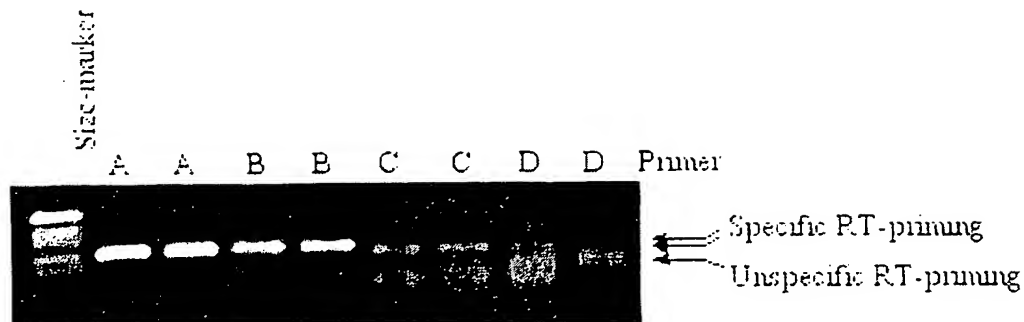


Fig. 6

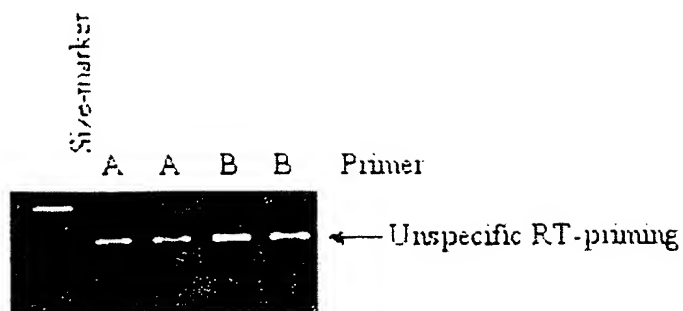


Fig. 7

SEQUENZPROTOKOLL

<110> QIAGEN GmbH

5 <120> Primer, insbesondere für Primer-abhängige
Nukleinsäure-Syntheseprozesse und
Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren

10 <130> PA059-PCT

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

20 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 1
aaacaccatg gtgggaaact 20

25

<210> 2
<211> 20
<212> DNA

30 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

35 <400> 2
aacaccatgg tgggaaactc 20

40 <210> 3
<211> 20
<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

45 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 3
ggtcggtggg tccgctgaaa 20

50

<210> 4
<211> 20
<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

5 <400> 4
gagcgggaag gcacagcaat 20

10 <210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

15 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

20 <400> 5
agaaggaaac accatggtgg 20

25 <210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

30 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

35 <400> 6
gaaggaaaca ccatggtggg 20

40 <210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

45 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

50 <400> 7
aaggaaacac catggtggga 20

55 <210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

55 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

55 <400> 8
aggaaacacc atggtgggaa 20

<210> 9
<211> 20
5 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a
10
<400> 9
ggaaacacca tgggtgggaaa 20

15 <210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

20 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 10
gaaacaccat ggtgggaaac 20
25

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
30 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

35 <400> 11
gattgagggc gtcattcagg a 21

<210> 12
40 <211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
45 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 12
gagggcgatca ttcaggatga 20

50

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
55

4

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 13

5 agggcgatcat tcaggatgaa

20

<210> 14

<211> 20

10 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

15

<400> 14

aagcttctgt tggctcccca

20

20 <210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

25 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 15

tggttggtcc ccaaagaaca

20

30

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

35 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

40 <400> 16

gcttctgttg gctccccaaa

20

<210> 17

45 <211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 17

gaagacgtgt aagcagtgca

20

55

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
5
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a
<400> 18
10 taggtgaaga cgaaggaaga 20

<210> 19
<211> 20
15 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a
20
<400> 19
agacgaagga agacgtgtaa 20

25 <210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

30 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 19
35 ggaggagcaa tgatcttga 19

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
40 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

45 <400> 21
gggtcggtgg gtccgctgaa 20

<210> 22
50 <211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
55 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

6

<400> 22
gtctcaagtc agtgtacagg 20

5

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

10

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 23
15 agaaggaaac accatggtgg 20

<210> 24
<211> 20
20 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

25

<400> 24
gtcctgtggc atccacgaaa 20

<210> 25
30 <211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 25
gccttccgac cgggagctca 20

40

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
45 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 26
50 ctcagtaacg gcgagtgaac 20

<210> 27
55 <211> 20

7

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

5 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:n/a

<400> 27

gtacttggtg actatcggtc

20

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Juli 2001 (12.07.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/49880 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (74) Anwalt: GINZEL, Christian; Zimmermann & Partner,
Postfach 330 920, 80069 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/13288 (81) Bestimmungsstaat (national): US.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
27. Dezember 2000 (27.12.2000) (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch Veröffentlicht:
... mit internationalem Recherchenbericht
- (30) Angaben zur Priorität:
199 63 857.8 30. Dezember 1999 (30.12.1999) DE (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 6. Dezember 2001
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4,
40724 Hilden (DE). Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KORFHAGE, Chris-
tian [DE/DE]; Sepp-Herberger-Strasse 6c, 40674 Langen-
feld (DE). OELMÜLLER, Uwe [DE/DE]; Millrather Weg
46, 40699 Erkrath (DE).

(54) Title: PRIMERS, IN PARTICULAR, FOR PRIMER-DEPENDENT NUCLEIC ACID SYNTHESIS PROCESSES AND NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHODS

(54) Bezeichnung: PRIMER, INSBESONDERE FÜR PRIMER-ABHÄNGIGE NUKLEINSÄURE-SYNTHESEPROZESSE UND NUKLEINSÄURE-AMPLIFIKATIONSVERFAHREN

(57) Abstract: The invention relates to primers which exhibit a high specificity and efficiency during hybridization with a target nucleic acid. To this end, the invention provides that a high proportion of bases, which can form two hydrogen bridge-type bonds with the corresponding bases in a target molecule, are predominant on the 3'-end of the hybridizing part of the primer. The 5'-end of the hybridizing part advantageously comprises a high proportion of bases which can form three hydrogen bridge-type bonds with the corresponding bases in the target molecule. The inventive primers are suited for use in primer-dependent nucleic acid synthesis processes, such as DNA syntheses and nucleic acid amplification methods, in particular, isothermal amplification methods. The inventive primers make it possible to significantly increase the yield of a specific amplification product and to reduce the production of undesired byproducts.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung gibt Primer an, welche eine hohe Spezifität und Effizienz bei der Hybridisierung mit einer Zielnukleinsäure zeigen. Erreicht wird dies im Wesentlichen dadurch, daß am 3'-Ende des Hybridisierenden Teils des Primers ein hoher Anteil an Basen vorherrscht, die zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit den korrespondierenden Basen in einem Zielmolekül ausbilden können. Das 5'-Ende des hybridisierenden Teils weist vorteilhafterweise einen hohen Anteil an Basen auf, die drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den korrespondierenden Basen in dem Zielmolekül ausbilden können. Die erfindungsgemäßen Primer sind geeignet für die Verwendung bei Primer-abhängigen Nukleinsäure-Syntheseprozessen, wie DNA-Synthesen, und Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, insbesondere isothermale Amplifikationsverfahren. Mit den erfindungsgemäßen Primern kann die Ausbeute an spezifischen Amplifikationsprodukt signifikant erhöht und die Produktion unerwünschter Nebenprodukte signifikant unterdrückt werden.

WO 01/49880 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/EP 00/13288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 762 939 A (HACKETT CRAIG STANWAY ET AL) 9 June 1998 (1998-06-09) see esp. col. 13, table 2 seq id 2	1-17
X	RYCHLIK W. ET AL.,: "a computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA" NUCLEIC ACID RESEARCH, vol. 17, no. 21, - 1989 pages 8543-8551, XP002136074 the whole document	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 July 2001

Date of mailing of the international search report

27/07/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mueller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/EP 00/13288

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DIEFFENBACH C W ET AL: "GENERAL CONCEPTS FOR PCR PRIMER DESIGN" PCR METHODS & APPLICATIONS,US,COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, vol. 3, 1 December 1993 (1993-12-01), pages S30-S37, XP000616084 ISSN: 1054-9803 ---	
A	HILLIER LADEANA ET AL: "OSP: A COMPUTER PROGRAM FOR CHOOSING PCR AND DNA SEQUENCING PRIMERS" PCR METHODS AND APPLICATIONS,COLD SPRING HARBOR, NY,US, vol. 1, 1991, pages 124-128, XP000964635 ISSN: 1054-9803 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/13288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5762939 A	09-06-1998	CA 2222129 A	28-11-1996
		CN 1194005 A	23-09-1998
		LT 97201 A, B	25-09-1998
		WO 9637624 A	28-11-1996
		AU 712776 B	18-11-1999
		AU 2692595 A	11-12-1996
		CZ 9703738 A	17-02-1999
		EP 0833933 A	08-04-1998
		HU 77921 A	28-10-1998
		NO 975434 A	19-01-1998
		US 6245532 B	12-06-2001
		US 5858368 A	12-01-1999
		AU 2814995 A	11-12-1996
		FI 974319 A	22-01-1998
		BR 9510590 A	30-11-1999
		JP 2000513922 T	24-10-2000
		SK 158897 A	11-06-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/13288

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 762 939 A (HACKETT CRAIG STANWAY ET AL) 9. Juni 1998 (1998-06-09) see esp. col. 13, table 2 seq id 2 ---	1-17
X	RYCHLIK W. ET AL.,: "a computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA" NUCLEIC ACID RESEARCH, Bd. 17, Nr. 21, - 1989 Seiten 8543-8551, XP002136074 das ganze Dokument --- -/--	1-17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Juli 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/07/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mueller, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/13288

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DIEFFENBACH C W ET AL: "GENERAL CONCEPTS FOR PCR PRIMER DESIGN"</p> <p>PCR METHODS & APPLICATIONS,US,COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS,</p> <p>Bd. 3, 1. Dezember 1993 (1993-12-01),</p> <p>Seiten S30-S37, XP000616084</p> <p>ISSN: 1054-9803</p> <p>----</p>	
A	<p>HILLIER LADEANA ET AL: "OSP: A COMPUTER PROGRAM FOR CHOOSING PCR AND DNA SEQUENCING PRIMERS"</p> <p>PCR METHODS AND APPLICATIONS,COLD SPRING HARBOR, NY,US,</p> <p>Bd. 1, 1991, Seiten 124-128, XP000964635</p> <p>ISSN: 1054-9803</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/13288

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5762939 A	09-06-1998	CA 2222129 A	28-11-1996
		CN 1194005 A	23-09-1998
		LT 97201 A, B	25-09-1998
		WO 9637624 A	28-11-1996
		AU 712776 B	18-11-1999
		AU 2692595 A	11-12-1996
		CZ 9703738 A	17-02-1999
		EP 0833933 A	08-04-1998
		HU 77921 A	28-10-1998
		NO 975434 A	19-01-1998
		US 6245532 B	12-06-2001
		US 5858368 A	12-01-1999
		AU 2814995 A	11-12-1996
		FI 974319 A	22-01-1998
		BR 9510590 A	30-11-1999
		JP 2000513922 T	24-10-2000
		SK 158897 A	11-06-1999

10

11

12

13